

## Ко-інтеграція генів при одночасній трансформації рослин *Arabidopsis thaliana* методом *in planta* різними векторами

В. В. Радчук

Інститут клітинної біології і генетическої інженерії НАН України  
Ул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 03143, Україна

Інститут садових рослин Федерального центру селекційних досліджень культурних рослин  
06484 Кведлінбург, Німеччина  
E-mail: V.Radchuk@bafz.de

---

*В результаті трансформації in planta рослин A. thaliana з допомогою суміші агробактерій, що містять три різні конструкції, отримано 68 трансгенних ліній. Сповіщається про високу частоту ко-інтеграції генів в результаті трансформації. Двадцять три рослини (34 %) містили мінімум дві Т-ДНК, а шість рослин (9 %) мали в своїх геномах всі три Т-ДНК з різних конструкцій. Сделано висновок про те, що частота встраювання різних генів не залежить від їх розміру, а в більшій мірі — від компетентності реципієнтних рослинних клітин.*

---

**Введення.** Трансформація рослин на сьогодні є основним методом дослідження експресії рослинних генів. Цей метод знаходить все більше застосування при дослідженні проблем фізіології і генетики рослин, а також в селекційній практиці. Основні успіхи були досягнуті в тих випадках, коли досліджувані характеристики були опосередковані одним геном, який і використовувався для переносу. Однак більшість продуктів в рослинній клітині продукується в різних шляхах біосинтезу і тому кодується і регулюється різними генами. Наявність системи переносу великої кількості генів в єдиний ген є необхідною умовою для можливості маніпулювання шляхами біосинтезу і переносу комплексних агрономічних характеристик.

Кількох чужорідних генів в єдиній конструкції можна отримати, використовуючи повторну трансформацію (ре-трансформація) або при перекрестному запиленні трансгенних по потрібним генам рослин. Альтернативним і більш ефективним методом може бути ко-трансформація, тобто використання при трансформації більш ніж одного

типу конструкції і/або агробактерії. Нескількома групами дослідників показано можливість ко-трансформації при прямому переносі генів в протопласти [1–4], піддавши електоропорації суміш двох різних плазмід. Частота ко-трансформації була досить високою. Однак во всіх випадках отримано тільки калусні культури. Можливо також багатократний перенос генів при використанні двох *A. tumefaciens*, несущих різні вектори [5, 6], з наступною регенерацією трансгенних рослин.

На сьогодні є тільки одне повідомлення про застосування більш ніж двох конструкцій для ко-трансформації. Чен і соавт. використовували 14 конструкцій з різними генами для трансформації ембріональної лінії рису з допомогою бомбардування мікрочастинками. Частота встраювання більш ніж одного чужорідного гена була дуже високою. Автори показали можливість переносу до 13 генів одночасно. Ефективність багатократного встраювання генів була обернено пропорційною їх кількості. Так, частота встраювання трьох генів була більш ніж 12 %, а 13 — менше 2 %. Однак даний метод має суттєві обмеження, пов'язані з великою складністю і тривалістю самого методу трансформації, і не може

быть использован для лабораторного исследования взаимодействия генов в геноме.

Между тем, за последнее время разработан очень простой, не требующий культуры *in vitro* и регенерации, но вместе с тем надежный и эффективный метод трансформации растений *A. thaliana* [8]. Метод заключается в инфильтрации агробактерии с помощью вакуума в цветки арабидопсиса. Трансгенные растения затем отбирают в последующем поколении среди семян.

В данной работе изучена возможность ко-трансформации растений арабидопсиса методом *in planta* при инфильтрации смеси агробактерий, несущих три разные генетические конструкции.

**Материалы и методы.** Семена *A. thaliana*, экотип Columbia, любезно предоставленные В. Кирком (IPK Gatersleben, ФРГ), высевали в грунт в 4-см горшочках. Растения выращивали при 16-ч длине дня и температуре 20 °С до цветения. Первичные цветоносы срезали, растения со вторичными цветоносами использовали для трансформации.

Генетические конструкции были созданы д-ром Фаруком при участии автора в IPK Gatersleben, (ФРГ). В работе использовали три генетические конструкции. Все они разработаны на основе бинарного вектора *pBIN19* [9], Т-ДНК во всех случаях содержит ген *nptII*, кодирующий устойчивость к канамицину. Дополнительно в Т-ДНК конструкции *pBINnisA<sub>2</sub>* был клонирован структурный ген биосинтеза антибиотика низина *nisA* [10] под управлением 35S-промотора и *osc*-терминатора. Кроме того, между геном и сайтом полиаденилирования встроены фрагмент KDEL [11], направляющий накопление трансгенного белка в мембранных структурах клетки и/или возможной его секреции в апопласт. Конструкции *pBINnisB<sub>2</sub>* и *pBINnisC<sub>2</sub>* содержат соответственно гены низинового оперона *nisB* и *nisC* [12]. Они управляются теми же промотором, терминатором и сайтом KDEL, что и ген *nisA* в векторе *pBINnisA<sub>2</sub>*. Генетические конструкции переносили в *A. tumefaciens* (штамм GV3101) с помощью триродительского скрещивания [13]. Для трансформации агробактерию выращивали при температуре 28 °С на качалке шейкерного типа (200 об/мин) в 300 мл среды YEB (5 г/л мясного экстракта, 2 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л пептона, 5 г/л сахарозы, 2 мМ MgSO<sub>4</sub>, 100 мг/л канамицина («Серва», ФРГ) и 100 мг/л рифампицина («Fluka», Швейцария)) на протяжении 20—28 ч до относительной плотности OD<sub>600</sub> ≥ 1,0. Затем агробактерию осаждали при 5000 об/мин в течение 20 мин и ресуспендировали в среде для инфильтрации (соли и витамины по Мурасиге-Ску-

гу (МС) [14], 0,01 мг/л бензиламинопурина, 50 г/л сахарозы, 100 мл/л Silwett («Lehle Seeds», США), pH 5,8).

При трансформации пользовались методикой, предложенной авторами [15] с некоторыми модификациями. Растения, у которых вторичные цветоносы достигли длины 5—15 см, помещали в эксикатор таким образом, чтобы в агробактериальную суспензию были погружены только цветоносы. Затем растения подвергали вакуумной инфильтрации при 0,1 атм. в течение 5—7 мин. После инфильтрации растения, не отмывая от остатков среды, выдерживали в течение 24 ч в темноте при относительной влажности, близкой к 100 %. Далее их промывали и оставляли в культуральной комнате до созревания семян.

Созревшие семена стерилизовали, используя разведенный водой (1:3) коммерческий раствор гипохлорита натрия с несколькими каплями твина, в течение 8 мин, далее тщательно промывали стерильной дистиллированной водой и равномерно распределяли в чашках Петри по поверхности среды для селекции (соли и витамины по МС, 30 г/л сахарозы, 5 г/л агарозы, pH 5,8, 250 мг/л карбенициллина, 75 мг/л канамицина). Через 10—12 дней отбирали зеленые сеянцы и высаживали их в грунт для цветения и созревания семян. Все полученные трансгенные растения анализировали на предмет интеграции чужеродных генов в их геномах с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). ДНК из растений выделяли из листовой ткани согласно методике, предложенной Дороховым и Клоке [16]. Для реакции использовали 100 нг ДНК из каждого образца, 1 мкмоль/л каждого из праймеров, 0,1 мкмоль/л смеси нуклеотидов, 0,5 единицы Taq ДНК-полимеразы, 1 × ПЦР реакционного буфера (все реагенты «Appligene», ФРГ). Общий объем смеси составил 12,5 мкл. Для определения наличия гена *nisA* использованы следующие праймеры: 5'-ATGGATCCAAAATGAGTACAAAAGAT-TTAAAC3' и 5'-ATTCTAGATTAGGGTTCGTCTTTTТАСТТАСГТГААТАСТА-СААТ-3', амплифицирующие фрагмент величиной 190 п. о. Для амплификации гена *nisB* применяли праймеры 5'-GGAACAATATCTTGGCAGTCTGA-3' и 5'-CGGCTTCTACATACATGCTGAGG-3', дающие фрагмент длиной 578 п. о., и для гена *nisC* — праймеры 5'-AGCTGGCATTGCATTAAGTATCCT-3' и 5'-CCAGAATAGCCATGGCAAATC-ATA-3', амплифицирующие фрагмент длиной 732 п. о. Изолированная ДНК из нетрансформированных растений (негативный контроль) и 3 нг каждого из векторов (позитивные контроли) были амплифицированы с теми же праймерами и при тех же

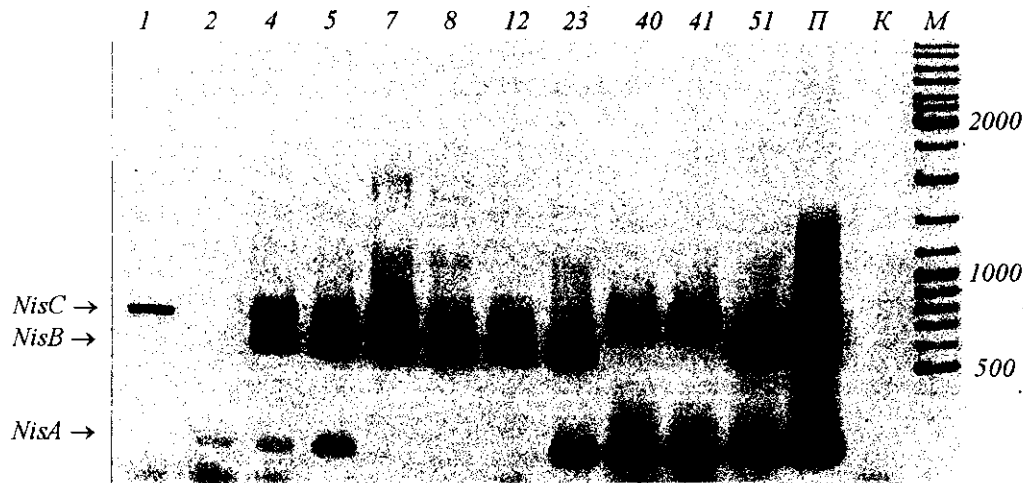


Рис. 1. Анализ некоторых отобранных трансгенных растений *A. thaliana* с помощью ПЦР: 1—51 — независимые линии; P — смесь конструкций, несущих *nisA*, *nisB* и *nisC* гены (позитивный контроль); K — нетрансформированное растение (негативный контроль); M — молекулярный маркер (п. о.)

условиях. Реакцию проводили в амплификаторе Autogene II («Grant Instruments Ltd.», Великобритания) с использованием следующего профиля: денатурация: 94 °С, 4 мин; затем 33 цикла 62 °С, 1 мин; 72 °С, 2 мин; 94 °С, 1 мин; в заключение 72 °С, 10 мин. После этого продукты ПЦР были проанализированы с помощью электрофореза в 1 %-м агарозном геле.

**Результаты и обсуждение.** После вакуум-инfiltrации *in planta* цветков 20 растений арабидопсиса смесью *A. tumefaciens*, несущих три различные конструкции, получено около 2,1 г семян, что соответствует около 105 тыс. штук. После селекции на среде с 75 мг/л канамицина проросшие трансгенные сеянцы оставались зелеными и продуцировали вторичные листья и корни, тогда как нетрансгенные вскоре становились белыми и погибали. Всего было отобрано 80 предположительно трансгенных линий, которые высадили в грунт и использовали в дальнейшей работе. С помощью ПЦР были тестированы 74 растения, 68 из них оказались трансгенными минимум по одному из используемых в трансформации генов (рис. 1). Абсолютная эффективность трансформации была очень низкой и составила 0,065 %, или 3,4 трансгенного растения из одного исходного, что, однако, соответствует данным других авторов [8].

Исходя из низкой эффективности выхода трансгенных растений теоретическая частота получения трансформированных растений при одновременном переносе двух или более Т-ДНК из различных конструкций должна быть близкой к нулю. Наши опыты противоречат теоретическим предположениям. По данным ПЦР, в результате одновременной трансформации тремя конструкциями из 68

трансгенных линий 23 имели более чем одну Т-ДНК, что составило около 34 %. А шесть растений (около 9 %) содержали в своих геномах все три гена из Т-ДНК трех различных конструкций. Ранее не сообщалось о столь высокой частоте встраивания двух и более генов в единичный растительный геном при ко-трансформации. В случаях ко-трансформации протопластов частота встраивания двух генов из различных конструкций составила 18—27 % [1—4], при использовании *Agrobacterium* — около 30 % [5].

На сегодня до конца не известно о точных молекулярных механизмах взаимодействия агробактерии с реципиентной растительной клеткой и переноса Т-ДНК в геном растения. Как видно из наших опытов, одна, две или более копий Т-ДНК могут встроиться в ядерный геном одной и той же растительной клетки. Более того, различные Т-ДНК могут быть перенесены в одну и ту же клетку различными бактериями. Поскольку количество растительных клеток, используемых при ко-культивации с агробактерией, значительно превышает число трансформированных, это служит основанием для предположения о том, что только некоторые клетки являются компетентными и могут быть трансформированы. В некоторых более ранних работах также показано, что встраивание генов при трансформации происходит не в случайные клетки, то есть не все клетки на момент взаимодействия являются компетентными [17].

Существуют две возможности для одновременного переноса двух и более Т-ДНК. Ко-интегрированная Т-ДНК может проникать в клетку, предварительно образовав некие комплексы для проникновения. Или, что более вероятно, существуют

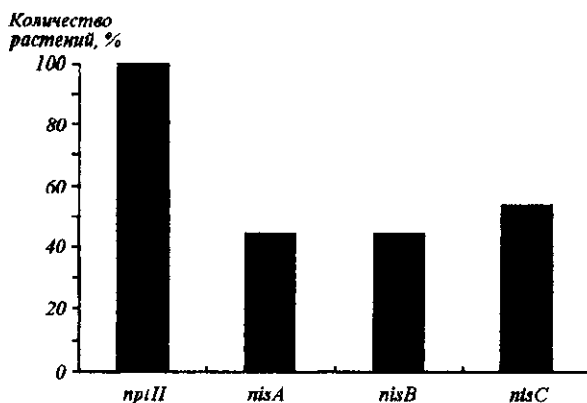


Рис. 2. Частота встраивания в геном растений каждого из используемых в опытах по ко-трансформации генов

временные «горячие точки» интеграции («hot spots»), в которые преимущественно и встраивается Т-ДНК [17]. Наши результаты также подтверждают большую вероятность второй гипотезы.

Т-ДНК из конструкций, используемых в наших опытах, содержат одни и те же компоненты, за исключением генов биосинтеза низина. Эти гены, в свою очередь, значительно различаются между собой по количеству нуклеотидов. Ген *nisA* состоит из 173 п. о., ген *nisB* — из 2981 п. о. [10, 12], то есть он примерно в 17 раз больше гена *nisA*. Ген *nisC* занимает промежуточное положение по величине между *nisA* и *nisB* и состоит из 1244 п. о. [12]. Между тем, из 68 полученных трансгенных линий 30 имеют в своем геноме *nisA* ген, 30 — *nisB* и 36 — *nisC* гены (рис. 2), если считать каждый из этих генов по отдельности. То есть вероятность встраивания более длинных генов в растительный геном практически такая же, как и для более коротких. Из этого можно сделать заключение, что эффективность переноса Т-ДНК не зависит от содержащихся в ней генов. Процесс интеграции чужеродных генов в растительный геном практически не зависит от длины встраиваемых генов, но в большей мере — от компетентности реципиентных клеток.

В результате трансформации арабидопсиса *in planta* с помощью вакуум-инfiltrации смеси агробактерий в цветущие растения было показано, что множественный перенос Т-ДНК из различных конструкций в растительный геном происходит с очень высокой эффективностью. Это позволяет использовать данный метод при исследовании раз-

личных биосинтетических путей, которые регулируются многими генами, а также при изучении полигенных агрономических признаков. На сегодня данный метод ограничен применением только *A. thaliana*. Однако недавно было сообщено об успешной трансформации *in planta* растений одной из форм капусты *Brassica campestris* L. var. *chinensis* [18]. Это дает основания предположить, что данный метод может быть разработан и для других хозяйственно ценных видов растений. Перенос и встраивание генов в определенных размерах не зависит от длины встраиваемой Т-ДНК, но главным образом — от компетентности реципиентных клеток.

V. V. Radchuk

Gene co-integration at simultaneous transformation of *Arabidopsis thaliana* plants by different vectors using the *in planta* method

#### Summary

As a result of *in planta* transformation of *Arabidopsis thaliana* plants by using *Agrobacterium* mixture, containing three different constructions, 68 transgenic lines have been obtained. High frequency of gene co-integration due to the transformation is reported. Twenty three (34 %) plants possessed two T-DNAs from different constructions, while six plants (ca. 9 %) were with all three T-DNAs. It has been concluded that the efficiency of gene transfer does not depend on the gene length but mainly on competence of the recipient plant cells.

В. В. Радчук

Ко-інтеграція генів при одночасній трансформації рослин *Arabidopsis thaliana* методом *in planta* різними векторами

#### Резюме

У результаті трансформації *in planta* рослин *A. thaliana* за допомогою суміші агробактерій, які містили три різні конструкції, отримано 68 трансгенних ліній. Повідомляється про високу частоту ко-інтеграції генів після трансформації. Двадцять три (34 %) рослини (34 %) містили мінімум дві Т-ДНК, а шість рослин (9 %) мали в своїх геномах усі три Т-ДНК з різних конструкцій. Зроблено висновок щодо того, що частота вбудовування генів не залежить від їхнього розміру, але в більший мірі — від компетентності реципієнтних рослинних клітин.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Christou P., Swain W.F. Cotransformation frequencies foreign genes in soybean cell cultures // *Theor. and Appl. Genet.*—1990.—79.—P. 337—341.
2. Schocher R. J., Shilito R. D., Saul M. W., Paszkowski J., Potrykus I. Co-transformation of unlinked foreign genes into plants by direct gene transfer // *Biotechnology.*—1986.—4.—P. 1093—1096.
3. Tagu D., Bergounioex C., Cretin C., Perennes C., Gadal P. Direct gene transfer in *Petunia hybrida* electroporated protoplasts: evidence for cotransformation with a phosphoenolpyruvate carboxylase cDNA from sorghum leaf // *Protoplasma.*—1988.—146.—P. 1021—1025.
4. Uchimia H., Hirochika H., Hashimoto H., Hara H., Masuda

- T., Kasumimoto T., Harada H., Ikeda J. E., Yoshioka M. Co-expression and inheritance of foreign genes in transformants obtained by direct DNA transformation of tobacco protoplasts // *Mol. and Gen. Genet.*—1986.—205.—P. 1—8.
5. De Block M., Debrouwer D. Two T-DNA's co-transformed into *Brassica napus* by a double *Agrobacterium tumefaciens* infection are mainly integrated at the same locus // *Theor. and Appl. Genet.*—1991.—82.—P. 257—263.
  6. Tircoli D. M., Carney K. J., Russel P. F., McMaster J. R., Groffi D. W., Hadden K. C. Field evaluation of transgenic squash containing single or multiple virus coat protein gene constructs for resistance to cucumber mosaic virus, watermelon virus 2 and zucchini yellow mosaic virus // *Bio/technology.*—1995.—13.—P. 1458—1473.
  7. Chen L., Marmey P., Taylor N. J., Brizard J.-P., Espinoza C., D'Cruz P., Huet H., Zhang S., de Kochko A., Beachy R. N., Fauquet C. M. Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants // *Nature Biotechnol.*—1998.—16.—P. 1060—1065.
  8. Bechtold N., Ellis J., Pelletier G. *In planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants* // *C. r. Acad. Sci. Paris, Life Sci.*—1993.—316.—P. 1194—1199.
  9. Bevan M. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation // *Nucl. Acids Res.*—1984.—12.—P. 8711—8721.
  10. Kaletta C., Entian K.-D. Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nisA* gene and posttranslational processing of its peptide product // *J. Bacteriol.*—1989.—171.—P. 1597—1601.
  11. Denecke J., De Rycke R., Botterman J. Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope // *EMBO J.*—1992.—11.—P. 2345—2355.
  12. Engelke G., Gutowski-Eckel Z., Hammelmann M., Entian K.-D. Biosynthesis of lantibiotic nisin: genomic organization and membrane localization of the *nisB* protein // *Appl. and Environ. Microbiol.*—1992.—58.—P. 3730—3743.
  13. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство / Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа.—М.: Мир, 1991.—408 с.
  14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.*—1962.—15.—P. 473—497.
  15. Bechtold N., Bouchez D. *In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult Arabidopsis thaliana plants by vacuum infiltration* // *Gene transfer to plants / Eds I. Potrykus, G. Spangenberg.*—Berlin: Springer, 1995.—P. 19—23.
  16. Дорохов Б. Д., Клоке Э. Быстрая и экономичная методика RAPD анализа растительных геномов // *Генетика.*—1997.—33.—С. 443—450.
  17. Tinland B. The integration of T-DNA into plant genomes // *Trends Plant Sci.*—1996.—1.—P. 178—184.
  18. Liu F., Cao M. Q., Yao L., Li Y., Robaglia C., Tourneur C. *In planta transformation of pakchoi (Brassica campestris ssp. chinensis) by infiltration of adult plants with Agrobacterium* // *Acta Hort. ISHS.*—1998.—467.—P. 187—192.

УДК 579.8

Надійшла до редакції 03.02.2000